

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-280273

(43)Date of publication of application : 10.12.1986

(51)Int.Cl.

C12N 9/14  
// (C12N 9/14  
C12R 1:20 )

(21)Application number : 60-123873

(71)Applicant : SEITETSU KAGAKU CO LTD

(22)Date of filing : 06.06.1985

(72)Inventor : AOKI KENJI  
HATAKEYAMA SHUICHIRO  
ARAYA TATSU  
NISHIRI HIROSHI

## (54) PRODUCTION OF BACTERIOLYTIC ENZYME

## (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a bacteriolytic enzyme useful for the research of cell fusion, etc., and the disinfection of foods and pharmaceuticals, etc., by culturing a bacterial strain belonging to Flavobacterium genus and capable of producing an enzyme dissolving the cell wall of microorganisms and separating the enzyme from the culture product.

CONSTITUTION: A bacterial strain belonging to Flavobacterium genus and capable of acting to the cell wall of microorganisms and dissolving the wall [e.g. Flavobacterium sp. SH-548 (FERM-P 8265)] is cultured in a medium and the culture liquid is centrifuged to remove the bacterial cells. The obtained supernatant liquid is added with ammonium sulfate to attain 60% saturation concentration and the precipitate is separated by centrifugation to obtain the objective bacteriolytic enzyme.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-280273

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
 C 12 N 9/14  
 //(C 12 N 9/14  
 C 12 R 1:20)

識別記号

101

庁内整理番号

7236-4B

⑭ 公開 昭和61年(1986)12月10日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 溶菌酵素の製造方法

⑯ 特 願 昭60-123873

⑰ 出 願 昭60(1985)6月6日

特許法第30条第1項適用 昭和59年12月8日発行の日本農芸化学会関西支部例会第337回講演会講演  
 要旨集にて発表

⑱ 発 明 者 青 木 健 次 神戸市灘区鶴甲4-9-21  
 ⑱ 発 明 者 畠 山 修 一 郎 芦屋市岩園町31-3  
 ⑱ 発 明 者 新 家 龍 兵庫県多紀郡篠山町小多田478  
 ⑱ 発 明 者 西 福 寛 兵庫県多紀郡篠山町大熊132  
 ⑲ 出 願 人 製鉄化学工業株式会社 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

## 明 細 書

## 1. 発明の名称 溶菌酵素の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) フラボバクテリウム属に属し、微生物の細胞壁に作用して、これを溶解する酵素を生産する能力を有する菌株を培養し、培養物から該酵素を採取することを特徴とする溶菌酵素の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔発明の目的〕

本発明の目的は、フラボバクテリウム属に属し、微生物細胞壁溶解酵素生産能を有する菌株を培養して、溶菌酵素を生産する方法を提供することにある。

## (産業上の利用分野)

溶菌酵素は、微生物細胞壁の構造および生理機能の解明や、細胞融合等の研究に必要なプロトプラストを調製する際等に有効に利用されている。また、このような学術的な面のみならず、実用面

においても、食品や医薬品等を殺菌し、あるいは各種微生物細胞内の有効成分の抽出に応用されている有用な物質である。

## (従来の技術)

## (発明が解決しようとする問題点)

従来、溶菌酵素としては卵白リゾチームの他に各種の微生物起源の酵素が知られている。しかし、その基質特異性や、溶菌する微生物の種類は様々であり、例えば溶菌酵素としては、 $\beta$ 1-4 グリコシダーゼ(N-アシルヘキソサミニダーゼ)、アミダーゼ(N-アシルムラミルアラニンアミダーゼ) ペプチダーゼが挙げられ、各々かなり広い範囲で細菌細胞壁を溶解し得る。

本発明者らは、難分解性物質の微生物による分解の研究において、アニリンを唯一の炭素源、窒素源として生育できる微生物として、ロドコッカス・エリスロポリス(Rhodococcus erythropolis) AN-13を見出したが、本菌は前記リゾチームを始めとする溶菌酵素では溶菌され

ないので、本菌の溶菌に有効な新規の溶菌酵素が必要となった。

#### 〔発明の構成〕

##### (問題を解決するための手段)

本発明者らは、このような状況に鑑み、酵素生産菌のスクリーニングを行ない、新規溶菌酵素生産菌について、前記ロドコッカス エリスロポリス AN-13 菌を溶菌できるような細胞壁溶解活性の高い酵素を生産する能力を有する微生物の検索を行った結果、土壌より分離された1菌株即ちフラボバクテリウム属に属する1菌株が溶菌活性の強い酵素を生産することを見出し、本発明に到達した。

即ち、本発明の要旨はフラボバクテリウム属に属し、微生物の細胞壁に作用してこれを溶解する酵素を生産する能力を有する菌株を培養し、培養物より該酵素を採取することを特徴とする溶菌酵素の製造方法である。

##### (作用)

本発明の菌株は、以下のような菌学的性質を有

寒 天 : -

##### (2) 糖類からの酸およびガスの生成

糖 類	酸	ガス
D-グルコース	-	-
ラクトース	-	-
シュクロース	-	-
マルトース	-	-

以上のような菌学的性質を有する菌について、バージェーズ・マニユアル・オブ・デターミネーティブ・バクテリオロジー 第8版(1974年)の分類に従って、フラボバクテリウム属に属する菌株と同定し、本菌株をフラボバクテリウム・エスピー SH-548 (Flavobacterium sp. SH-548) と命名した。本菌株は、微生物技術工業技術研究所に微工研菌寄第8265号として寄託されている。

前記菌株を用いて、活性の高い溶菌酵素を得るための培養条件は、次のようなものである。培地の炭素源としては、例えばグルコース、マンノー

している。

##### (a) 形 態

- (1) 細菌の形態：桿菌 0.5~0.8×2.0~2.5 $\mu$
- (2) 鞭 毛：なし
- (3) 胞 子：なし
- (4) グラム染色：陰性

##### (b) 各培地における生育状態

- (1) 肉汁寒天平板培養：コロニー円形、凸円状、全縁、平滑、光沢、半透明、黄色
- (2) 肉汁寒天斜面培養：生育良好、不溶性黄色色素生成
- (3) 生育温度：10~30℃、35℃では生育しない。

##### (c) 生理学的性質

###### (1) 加水分解

ゼラチン	+
カゼイン	+
デンプン	+
セルロース	-
キチン	-

ス、ラクトース、マルトース、デキストリン等が用いられる。窒素源としては、例えば肉エキス、ポリペプトン、酵母エキス、カザミノ酸、グルタミン酸ナトリウム等を使用することができる。無機塩としては、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $NaCl$ 等の各種無機塩を用いることができる。培地のpHは6~8、好ましくはpH 6.8、培養温度は20~30℃、培養時間は15~48時間が好ましい。

培養終了後、培養液を戸過あるいは遠心分離等の手段により除菌して粗酵素液を得ることができる。

溶菌酵素活性の測定は、以下の方法により行なった。微生物の洗浄菌体を25 mM リン酸緩衝液(pH 7.1)に660 nmでの吸光度が、0.7になるように懸濁し、この懸濁液3 mlに酵素液0.1 mlを加え、35℃で30分間反応させ濁度の減少を測定した。酵素活性の1単位は、上記条件下で1分間に濁度を0.001減少させる酵素量とした。

本発明によって得られる溶菌酵素の性質を粗酵素液を用いて検討した。

(1) 至適 pH

溶菌活性の至適 pH は、第 1 図に示したように pH 7 ~ 7.5 であった。

(2) pH 安定性

粗酵素の 4℃、24 時間保持後の pH 安定性は、第 2 図に示したように pH 4.5 ~ 9.0 の範囲で安定であった。

(3) 熱安定性

粗酵素を pH 7.1、各温度で 10 分間処理した後の残存活性を測定した。本酵素は第 3 図に示したように 35℃までは安定であるが、50℃では約 50% が失活した。

(4) 各種微生物に対する溶菌活性

粗酵素の各種微生物に対する溶菌能を検討した。各菌株は、対数増殖期後期に集菌し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.1) で 3 回洗浄した後、使用した。表 1 に示したよ

うに本酵素は、スタフィロコッカス・アウレウスとストレプトマイセス・リモシス以外のグラム陽性菌を溶かしたが、グラム陰性菌に対しては、ほとんど効果がなかった。

表 1

供 試 微 生 物	溶菌活性 (単位/ml)
アースロバクター・シンプレックス	66
アースロバクター・ウレアファシエンス	34
バチルス・サーキュランス IFO13626	269
バチルス・リケニホルミス IFO12200	378
バチルス・メガテリウム	177
バチルス・ズブテリス IFO3009	517
プレビバクテリウム・リネンス	201
*プレビバクテリウム・テストセウム	113
セルロモナス・フラビグナ	129

供 試 微 生 物	溶菌活性 (単位/ml)
*コリネバクテリウム・ジフテリアエ	55
*コリネバクテリウム・エクイ	156
DAB-タイプ コリネホーム細菌 * AN- 3	15
* AN- 6	90
AN- 9	51
* AN-11	131
* AN-14	154
AN 15	14
* AN-20	72
ミクロコッカス・リゾダイクティカス	289
*ミクロモノスポラ・カルセア	95
*ノカルディア・アスタロイデス	284
*ノカルディア・エリスロポリス IFO12682	68

供 試 微 生 物	溶菌活性 (単位/ml)
*ロドコッカス・エリスロポリス AN- 1	179
AN- 2	151
AN- 5	340
AN-12	208
AN-13	360
AN-17	82
AN-18	160
AN-19	129
スタフィロコッカス・アウレウス	0
ストレプトコッカス・フェカリス	124
ストレプトマイセス・リモシス	0
ストレプトマイセス・ベネズエラ	101
エンテロバクター・アエロゲネス IFO13534	0
エッシュエリヒア・コリ IFO3301	0

供 試 微 生 物	溶菌活性 (単位/μl)
シュウドモナス・マルトフィラ AN-4	0
セラチア・リケファシエンス IFO12979	11

本酵素は、菌株の前に\*印を付したグリコリル型細胞壁を有する細菌に対しても作用する特色を有していた。加藤等は、フラボバクテリウム・エスビー-Iの生産する溶菌酵素を報告しているが(ビケン・ジャーナル 5 155, 1962)本酵素とは、スタフィロコッカス・アウレウスに作用する点で異なっている。

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳しく説明する。

#### 〔実施例〕

デキストリン 0.25%, 肉エキス 1%, ポリペプトン 0.5%, NaCl 0.2%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0.025%,  $KH_2PO_4$  0.2%,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  0.74%を含む pH 6.8 の培地 150ml を 500 ml 容坂口フラスコに分注し、121℃, 15 分間加圧滅菌した。これに予め同培地にフラボバクテリウム・エスビー SH-548 を前培養した菌液 5 ml を接種し、30℃で18時間振とう培養した。培養終了後、遠心分離により菌体を除き、培養上澄液を得た。次に、この培養上澄液に硫酸アンモニウムを60%飽和になるように添加した。遠心分離して得た沈殿を10 mM のリン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解し、これを同緩衝液に対して透析し、酵素液を得た。培養上澄液および硫酸アンモニウム沈殿液のロドコッカス・エリスロポリス AN-13 および バチルス・ズブチリスの凍結乾燥菌体に対する溶菌活性を測定した。

#### 〔発明の効果〕

本発明のフラボバクテリウム・エスビー SH-548 菌より生産される酵素を用いると、従来リゾチームでは溶菌されなかったグリコリル型細胞壁を持つ細菌を溶菌することができ、プロトプラストの調製や、細胞内の有効成分の種々な抽出等に極めて有効であり、この方面での利用が期待できる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1～3図は、本発明のフラボバクテリウム・エスビー SH-548 株によって産生された溶菌酵素の性質を示すグラフであって、第1図は至適 pH、第2図は pH 安定性、第3図は熱安定性を示す。

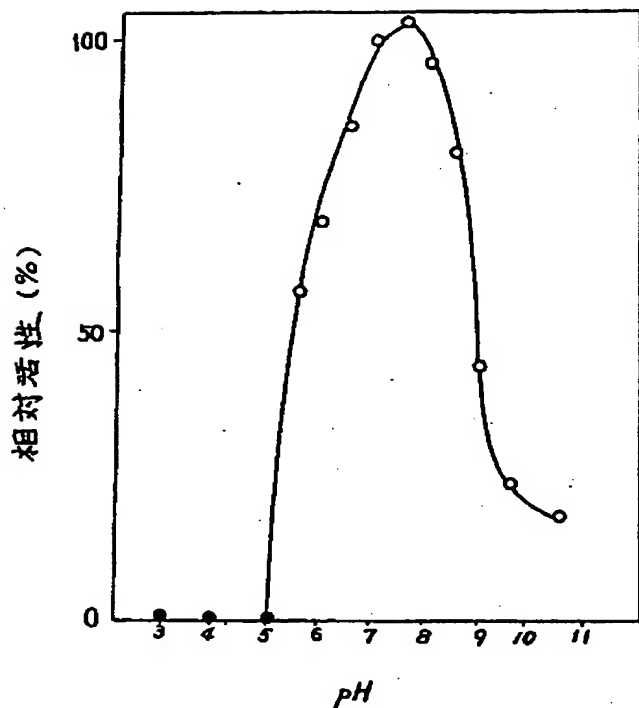
出願人 製鉄化学工業株式会社

代表者 佐々木 浩

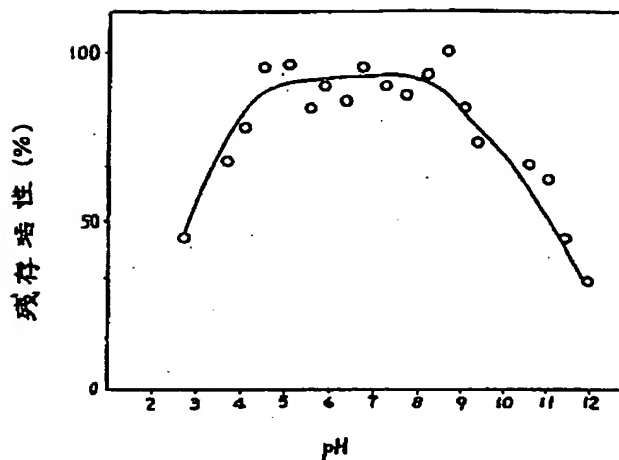
酵 素	基 質	総 活 性 (単位)	総蛋白質 (mg)	比 活 性 (単位/mg)	精製度	活性収率 (%)
培 養 上 澄 液	R	$8.18 \times 10^6$	7050	$116 \times 10^3$	1	100
	B	$11.5 \times 10^6$		$163 \times 10^3$	1	100
硫酸 60% 飽和成分	R	$5.93 \times 10^6$	1050	$565 \times 10^3$	487	72
	B	$9.31 \times 10^6$		$888 \times 10^3$	545	81

R: ロドコッカス・エリスロポリス AN-13 B: バチルス・ズブチリス

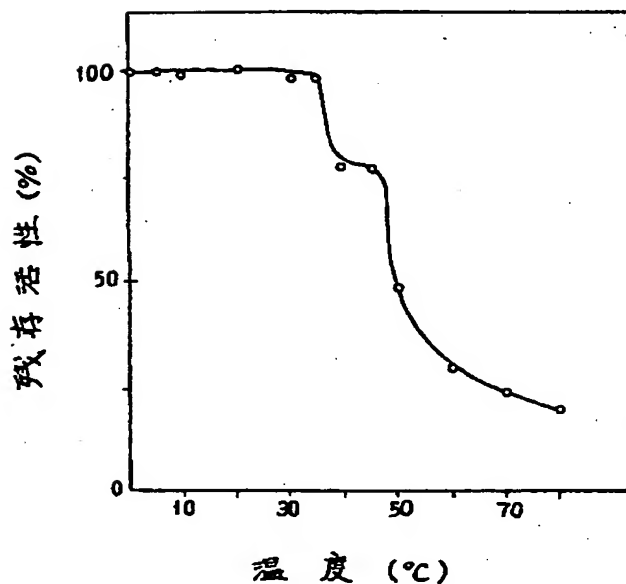
才1図



才2図



才3図



手続補正書 (自発)

昭和60年7月12日

特許庁長官 志賀 学園

- 1 事件の表示  
昭和60年特許願第123873号
- 2 発明の名称  
溶菌酵素の製造方法
- 3 補正をする者  
事件との関係 特許出願人  
〒675-01  
住 所 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1  
名 称 製鉄化学工業株式会社  
(TEL0794-37-2151)

代表者 増田 裕治

4. 補正の対象 明細書

5. 補正の内容

- (1) 明細書第2頁9行「β1-4グリ」を「β-1, 4-グリ」と補正する。
- (2) 明細書第5頁13行「(Flavobacterium sp. SH-548)」を「(Flavobacterium sp. SH-548)」と補正する。

以上